

Applicability of toxicogenomics in molecular epidemiology : Gene expression profiling as a new biomarker

Citation for published version (APA):

van Leeuwen, D. M. (2006). *Applicability of toxicogenomics in molecular epidemiology : Gene expression profiling as a new biomarker*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20061207dl>

Document status and date:

Published: 01/01/2006

DOI:

[10.26481/dis.20061207dl](https://doi.org/10.26481/dis.20061207dl)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is uitgevoerd met als voornaamste doel het ontwikkelen van genexpressieprofielen als een nieuwe biomarker van vroege respons op blootstelling aan chemische carcinogenen, voor uiteindelijke toepassing in een humane biomonitoring studie. De verscheidenheid aan biomarkers die momenteel in gebruik zijn in het veld van de moleculaire epidemiologie, omvat nog geen biomarkers die generieke, biologisch relevante en mechanistische informatie bieden. Omdat de respons van een cel op xenobiotische blootstelling, zoals aan chemische carcinogenen, gedeeltelijk het gevolg is van veranderingen in de expressie van genen, wordt het monitoren van veranderde genexpressieprofielen gezien als een veelbelovende benadering voor de identificatie van nieuwe biomarkers. Met het oog op de conceptuele basis van de biomarkers (Figuur 2 in **Hoofdstuk 1**) wordt genexpressie voorgesteld een vroeg biologische respons op xenobiotische blootstelling te zijn, tussen de biomarkers van blootstelling en die van vroeg biologisch effect in, omdat het wordt gezien effecten weer te geven die in principe omkeerbaar zijn.

Ten behoeve van het evalueren van de potentie van genexpressieprofielen als nieuwe biomarker zijn zowel experimentele *in vitro* als *in vivo* validatie en case studies uitgevoerd, voornamelijk gebruik makend van surrogaat doelwit-weefsel, maar ook doelwit-weefsel voor milieublootstellingen. Perifere bloedcellen (PBC) zijn gebruikt voor het grootste deel van het onderzoek omdat dit het algemeen geaccepteerde surrogaat doelwit-weefsel is in de moleculaire epidemiologie ten behoeve van gebruik in humane biomonitoringstudies en een gemakkelijk toegankelijke biologische matrix representeert, die van mensen verkregen kan worden onder weinig invasieve omstandigheden. In die, vaak grootschalige, studies met humane individuen kunnen de doelwitweefsels of cellen, zoals epitheelcellen uit de luchtwegen, niet worden verkregen om ethische redenen.

Het onderzoek is van start gegaan met een exploratieve *in vitro* studie zoals beschreven in **Hoofdstuk 2**, met als doel het onderzoeken van veranderingen in genexpressie in geïsoleerde, rustende, perifere mononucleaire bloedcellen (PBMC). De genexpressierespons van de PBMC op sigarettenrookcondensaat (CSC) of zijn individuele bestanddelen benzoapyreen (BaP), 4-aminobifenyyl (4-ABP), NNK (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon) en waterstofperoxide (H_2O_2) werd onderzocht gebruik makend van microarrays welke een verscheidenheid aan toxicologisch relevante genen representeren. De blootstellingen induceerden duidelijk significante veranderingen in genexpressie, zowel verhoogde als verlaagde expressie. Deze studie kende twee doelen. Ten eerste werd een set van 16 genen geïdentificeerd welke reageerden op alle carcinogenen en daarom gezien werden een algemene respons op toxische blootstelling te representeren. Echter, wanneer de expressie van deze genen individueel bestudeerd werd vertoonde geen van de genen een consistente verandering in termen van de richting van de regulatie. Daarom werd deze set genen niet gezien als een bruikbare algemene biomarker. Ten tweede werden de meest gevoelige responsen per individueel carcinogeen geïdentificeerd, welke werden gedefinieerd als de genen die (hoog) significante differentiatie regulatie vertoonden bij blootstelling aan de laagste of gemiddelde concentratie. Dit leverde verschillende sets genen op voor elk carcinogeen, waarbij CSC de meeste genen induceerde in vergelijking met de individuele carcinogenen. Dit was in overeenstemming met de *a priori* verwachtingen, omdat CSC een mix is van een groot aantal toxische en carcinogene verbindingen die worden verwacht genexpressie te beïnvloeden. De expressie van een selectie van genen werd geverifieerd met een onafhankelijk

assay, SYBR Green I real-time polymerase chain reaction (PCR), welke de observeringen van de microarray analyses bevestigde. Analyse van veranderde functionaliteit, namelijk overgerepresenteerde Gene Ontology termen voor biologische processen of moleculaire functies in de lijsten van significant reagerende genen, werd uitgevoerd met het online programma Expression Analysis Systematic Explorer (Expressie Analyse Systematische Verkenner; EASE). Immuunrespons en afweerrespons werden geïdentificeerd als meest significant overgerepresenteerde biologische processen. Concluderend heeft deze *in vitro* studie aangetoond dat genexpressieveranderingen ontstaan door blootstelling aan CSC en zijn bestanddelen. Dit resulteerde in sets van gevoelig reagerende genen die een basis kunnen bieden voor de selectie van toekomstige kandidaat biomarker genen, echter welke zullen moeten worden geverifieerd in *in vivo* studies.

De *in vitro* studie werd opgevolgd door de eerste van twee *in vivo* humane biomonitoring studies, welke het onderwerp is van **Hoofdstuk 3**. Perifeer bloed van eenenijge tweelingparen discordant voor het roken van sigaretten, *i.e.* elk tweelingpaar bestond uit een roker en een niet-roker, werd geanalyseerd voor de effecten van roken op genexpressie, wederom gebruik makend van toxicologisch toegepaste microarrays. Eenenijge tweelingen werden bestudeerd om de mogelijke invloed van (verschillen in) genetische achtergrond op genexpressie te beperken. Het PAXgene Blood RNA systeem werd gebruikt, omdat voor deze studie bloed werd afgenomen bij mensen op een locatie waar geen directe of gestandaardiseerde isolatie van PBMC mogelijk was. Opslag en transport van biologische materialen vormt een praktisch punt van aandacht in humane biomonitoring, in het bijzonder voor het huidige onderzoek dat zich concentreert op het instabiele RNA. Het PAXgene systeem biedt RNA stabilisatie en conservering; op die manier wordt het genexpressieprofiel in het bloed *ex vivo* meteen 'bevroren'. Met het systeem werd RNA van hoge kwaliteit geïsoleerd. Deze studie werd uitgevoerd met twee doelen, inclusief een benadering voor het 'benchmarken' of 'fenotypisch verankeren' van de genexpressies door correlaties met een gevestigde en gevalideerde biomarker van biologisch effectieve dosis: aromatische DNA adducten. Ten eerste werden de meest significant differentieel tot expressie komende genen tussen de rokers en niet-rokers geïdentificeerd, door de combinatie van resultaten van verscheidene statistische tests, als die genen met significante resultaten in elk van die tests; *ATF4*, *SOD2* en *MAPK14*. Deze resultaten werden bevestigd door middel van real-time PCR. Daarnaast werd real-time PCR gebruikt voor het analyseren van de expressie van *CYP1B1* en *SERPINB2*, twee genen die geen significantie lieten zien in de microarray analyses. De resultaten toonden significante toegenomen expressie van alle genen in rokers ten opzichte van niet-rokers, wat in overeenstemming is met bevindingen van andere studies (*CYP1B1*) en de voorgaande studie in PBMC blootgesteld aan sigarettenrookcondensaat *in vitro* (*SERPINB2*, **Hoofdstuk 2**). De tweede benadering omvatte het onderzoeken van associaties tussen individuele genexpressies en DNA adduct niveaus. Correlatie analyses onthulden zeven genexpressies die sterk en significant correleerden met de DNA adduct waarden. Wederom werd SYBR Green I real-time PCR gebruikt ter bevestiging van de microarray resultaten. Real-time PCR kon echter de correlaties van genexpressies met DNA adduct waarden niet bevestigen. Daarom werden deze genen niet langer gezien.

De studie zoals beschreven in **Hoofdstuk 4** was erop gericht de effecten van blootstelling aan sigarettenrook te analyseren op het doelwitorgaan. Het doel was het vergelijken van genexpressie responsen in surrogaat en in doelwitweefsel door het onderzoeken van differentiële genexpressies in primaire normale humane bronchiale

epitheelcellen (NHBE) *in vitro* en door de bevindingen te vergelijken met observaties uit de voorafgaande *in vitro* PBMC studie (**Hoofdstuk 2**) en de *in vivo* rokers versus niet-rokers studie (**Hoofdstuk 3**). NHBE cellen werden blootgesteld aan verschillende concentraties CSC gedurende verschillende perioden. Genoomwijde genexpressie werd geanalyseerd met Agilent Human 22k oligonucleotide microarrays, die meer dan 20.000 geannoteerde gensequenties representeren. Een set genen werd geïdentificeerd welke vergelijkbare significante responsen vertoonden op de blootstellingen in zowel surrogaat als doelwitweefsel *in vitro*. Ook werd een aantal genen gezien te reageren in doelwitweefsel alsook in het bloed van rokers *in vivo*. Cytochroom P450 1B1 (*CYP1B1*) was het enige gen dat significante expressieresponsen vertoonde in zowel bloedcellen *in vitro* en *in vivo* als in de NHBE cellen *in vitro*. Naast het onderzoek in verschillende celtypen, zou het gebruik van verschillende typen of platformen van microarrays hiertoe hebben kunnen bijdragen. Verhoogde expressie van *CYP1B1* is in lijn met literatuur over de overexpressie van dit gen na chemische of genotoxische blootstelling in beide celtypen. Concluderend kan gezegd worden dat CSC effecten induceerde in de NHBE cellen en dat deze effecten tot op zekere hoogte de voornaamste effecten zoals eerder geobserveerd in perifere bloedcellen bevestigen.

Een tweede populatiestudie, uitgevoerd in de Tsjechische Republiek, wordt beschreven in **Hoofdstuk 5**. Twee verschillende eigenschappen van deze studie in vergelijking met de eerder beschreven studies, zijn het onderzoek in kinderen in plaats van volwassenen en de chemische blootstelling zijnde luchtverontreiniging. Om het onderzoek naar mogelijke biomarkergenen te verrijken werd deze studie geïncludeerd, daar de blootstelling aan luchtverontreiniging een meer algemene en veelvoorkomende blootstelling aan een complex mengsel van chemische carcinogenen vormt dan sigarettenrook. Kinderen wonend in de omgeving van Teplice in de Tsjechische Republiek werden onderzocht omdat dit gebied bekend staat om zijn (historisch) zeer hoge concentraties van luchtverontreinigende stoffen, zoals (carcinogene) polycyclisch aromatische koolwaterstoffen (PAH). Voor het analyseren van differentiële genexpressies werden Agilent Human 22k oligonucleotide microarrays gebruikt. Genoomwijde genexpressie in bloed van de kinderen uit Teplice werd bestudeerd in vergelijking met dat van kinderen wonend in een relatief schoon gebied in de Tsjechische Republiek, Prachatic. Daarnaast werden de genexpressies onderzocht op associaties met individuele micronuclei frequenties, welke een biomarker voor vroeg biologisch effect representeren. Omdat de blootstelling aan omgevingsvervuiling in deze studie relatief laag is, vergeleken met bijvoorbeeld arbeidsgerelateerde blootstelling aan carcinogenen of het roken van sigaretten, werd geanticipeerd op het zien van relatief lage aantallen significant gemoduleerde genexpressies. De analyses waren daarom geconcentreerd op het identificeren van overgerepresenteerde biologische processen en moleculaire functies in de lijsten van significant veranderde genen. Aanzienlijke aantallen genen werden geïdentificeerd waarvan de expressie significant verschilde tussen de twee groepen kinderen. De meest significant verrijkte (overgerepresenteerde) biologische processen in deze lijsten waren gerelateerd aan nucleosoom en chromatine structuur en behoud (opbouw en afbraak), wat deregulatie van de primaire structurele bouwsteen van het DNA suggereert. Ook werd voor veel genexpressies een significante correlatie met micronuclei frequentie gevonden. Uiteindelijk werd in deze studie een set van vijf genen geselecteerd voor bevestiging met real-time PCR: *CXCL1*, *DGAT2*, *TIGD3*, *PINK1* en *FXN*, waarvan alle behalve *FXN* werden bevestigd. Criteria voor selectie waren een statistisch significant

verschil in expressie in Teplice kinderen in vergelijking met de Prachatice kinderen alsook een significante correlatie van de expressie met micronuclei frequentie. Concluderend suggereren de resultaten van deze studie dat genexpressieprofilering een haalbare en veelbelovende toepassing vormt voor toepassing in het onderzoeksveld van milieugezondheid ('environmental health'). Daarom lijkt het relevant meer populaties te monitoren voor genexpressie-responsen op carcinogene contaminanten uit het milieu.

Als laatste beschrijft **Hoofdstuk 6** de toepassing van een genexpressieprofiel, gedistilleerd uit de voorafgaande studies, in humane biomonitoring. Een grootschalige biomonitoring-studie werd uitgevoerd naar differentiële genexpressies in perifere bloed van geselecteerde populaties van volwassenen in Vlaanderen, die verschillende milieu- of omgevings-blootstellingen meemaken als gevolg van hun woonomgeving. Acht regio's met karakteristieke theoretische milieubelasting werden geïncludeerd; steden met druk verkeer, omgevingen van verbrandingsovens of industrieën alsook gebieden met fruitteelt en het platteland. Gezien het benodigde aantal studiedeelnemers in deze grootschalige biomonitoring, de studie omvatte bijna 400 individuen, werd real-time PCR gebruikt voor genexpressieanalyse in plaats van microarray technologie. Ten behoeve van het onderzoek beschreven in dit proefschrift werden microarray analyses uitgevoerd ter ontwikkeling van het genexpressieprofiel zoals het gemonitord werd in de studie beschreven in dit hoofdstuk. Op basis van voorafgaande studies in humane populaties blootgesteld aan sigarettenrook en luchtverontreiniging, zoals beschreven in **Hoofdstukken 3 en 5**, werden acht genen geselecteerd om gemonitord te worden in de Vlaamse populatie: *CYP1B1*, *ATF4*, *MAPK14* en *SOD2* op basis van de resultaten van de studie naar tweelingen discordant voor roken en *CXCL1*, *TIDG3*, *DGAT2* en *PINK1* uit de studie naar kinderen blootgesteld aan luchtverontreiniging. Voor een aantal van deze genen geldt dat hun huidige bekende functies biologisch relevant zijn voor milieu- of carcinogene blootstelling (zie Tabel 1 in **Hoofdstuk 6**). De focus in deze studie was op het kankerrisico in volwassen mensen met als onderliggende hypothese dat volwassenen lang genoeg blootgesteld kunnen zijn om een plausibel risico te lopen op het ontwikkelen van kanker. De resultaten van deze studie toonden de potentie van genexpressie aan in het onderscheiden van woonregio's met verschillende milieublootstellingen, omdat werd waargenomen dat genexpressies en het genexpressieprofiel als geheel significant verschilden tussen regio's met verschillende karakteristieken. De meest significante verschillen werden gezien tussen de regio's van Olen (aanwezigheid van een non-ferro industrieel bedrijf) aan de ene kant en de regio's van fruitteelt en de stad Gent aan de andere kant. Daarnaast werden significante associaties van genexpressies gevonden met DNA schade, zoals gemeten met de COMET assay, en met eiwitconcentraties van tumormarkers in serum. Dit hoofdstuk concludeert daarom dat genexpressieprofilering een veelbelovende toepassing is voor humane biomonitoringstudies die milieuge-relateerde kankerrisico's analyseren.

Sensitiviteit en specificiteit zijn belangrijke karakteristieken voor een biomarker. De studies beschreven in dit proefschrift leverden alle aanzienlijke aantallen significant gemoduleerde genexpressies op in blootgestelde vergeleken met niet blootgestelde cellen of individuen. De resultaten van de studies in humane populaties werden steeds geanalyseerd op groepsniveau en alleen de (meest) statistisch significante resultaten werden gerapporteerd, wat de mogelijke invloed van interindividuele variatie verlaagde. Het staat niet vast hoe de sensitiviteit van genexpressie als biomarker te bepalen, omdat genexpressieprofilering meerdere eindpunten behelst. Sensitiviteit van veranderde gen-

expressie is een gevoelige zaak en kan op meerdere manieren geïnterpreteerd worden; met het oog op de grootte van de gemeten effecten (maat van toegenomen of afgenomen expressie), op het niveau van significantie van het verschil tussen blootgestelde en niet blootgestelde groepen of de mogelijkheid tot het weerspiegelen van kleine verschillen in blootstelling of blootstelling aan lage doses. Sensitiviteit kan onderzocht worden door het vergelijken van de grootte van de effecten in genexpressie (-voud toegenomen of afgenomen expressie) met die gemeten aan de klassieke biomarkers zoals DNA adducten, micronuclei en COMET waarden. Bijvoorbeeld, in de studie naar differentiële genexpressie geïnduceerd door sigarettenrook in eenjarige tweelingen (**Hoofdstuk 3**) was het gemiddelde DNA adductniveau 1.67 maal hoger in rokers dan in niet-rokers, terwijl de meest significant gemoduleerde en met real-time PCR bevestigde genexpressies 1.11 tot 1.45-voudige verschillen vertoonden (op een log₂ schaal 0.15 tot 0.54). Daarnaast was in de studie onder de Tsjechische kinderen (**Hoofdstuk 5**), de overexpressie van micronuclei in de Teplice kinderen 1.38-voud hoger dan in Prachatic kinderen. Van de 26 meest significant differentieel tot expressie komende genen ($p < 0.0001$ voor het verschil tussen Teplice en Prachatic) lag de grootte van het effect tussen 1.14 en 1.43-voud (0.19 tot 0.52 op een log₂ schaal). In de biomonitoringstudie beschreven in **Hoofdstuk 6** werd waargenomen dat de meerderheid van de genexpressies significant verschilde tussen twee of meer woonregio's, terwijl dit niet opging voor alle klassieke biomarkers of deze markers niet significant verschilden in dezelfde mate als de genexpressie. Daarnaast werden redelijk gelijkwaardige grootheden van verschillen geobserveerd tussen de regio's met de laagste en hoogste waarden voor genexpressie en de andere parameters; variërend van 1.2 (*DGAT2*) tot 2.0 (*ATF4*) en van 1.10 (COMET count) tot 2.43 (COMET median) respectievelijk. Dus, in de gepresenteerde studies waren de effecten (verschillen tussen blootgesteld en niet blootgesteld of tussen de regio met de hoogste versus de laagste blootstelling) in genexpressie vergelijkbaar met de effecten in de klassieke biomarkers. De studie beschreven in **Hoofdstuk 5** rapporteert daarnaast differentiële genexpressies in populaties blootgesteld aan hun omgeving in het dagelijkse leven, dat wordt gezien als een redelijk lage-dosis blootstelling. De aantallen genen die werden gezien te verschillen in expressie tussen individuen uit de luchtverontreinigde regio en uit de relatief schone regio en de mate van significantie van deze verschillen verwijzen ook naar sensitiviteit van genexpressieanalyses.

Specificiteit van genexpressie werd *a priori* gezien als hoog, omdat de analyse van grote aantallen genexpressies tegelijkertijd meer generieke en biologisch relevante informatie oplevert over cellulaire effecten veroorzaakt door carcinogene blootstelling dan de klassieke biomarkers zoals DNA adducten of micronuclei frequenties inhouden. Genexpressiesignaturen zijn beschreven met het oog op specificiteit van genexpressieprofielen voor specifieke chemicaliën [1-3]. Daarom zou het in theorie mogelijk moeten zijn een specifieke set genen te ontwikkelen voor de respons op specifieke blootstellingen aan chemische stoffen of mengsels daarvan, zoals sigarettenrook of luchtverontreiniging. De bevindingen suggereren inderdaad dat genexpressieprofilering specifiek is daar verschillende expressieveranderingen werden geïdentificeerd als respons op het roken van sigaretten en op luchtverontreiniging en ook genen werden geïdentificeerd welke niet eerder gerapporteerd zijn. Hoewel de typen omgevings- of milieublootstellingen onderzocht in dit proefschrift de meest voorkomende carcinogene mengsels representeren in het dagelijks leven van de mens, zou toekomstig onderzoek zich moeten

richten op het bestuderen van (populaties blootgesteld aan) meer en andere chemische carcinogenen. Andere aanbevelingen en toekomstperspectieven zijn de volgende.

- Onderzoek naar meer chemische carcinogenen in meer concentraties en verschillende blootsteldsduren *in vitro*, om kennis uit te breiden over chemicaliën-specifieke, concentratie- en tijdsgerelateerde genexpressiereacties.
- In de biomonitoringstudie zoals beschreven in **Hoofdstuk 6** zal het betrekken van meetgegevens over interne dosis markers voor bijvoorbeeld PAH, PCB en zware metalen, beter inzicht geven in de individuele blootstellingen en associaties van deze interne dosis markers met de genexpressies. Dit zal een breed spectrum aan biomarkers gemeten in de Vlaamse volwassenen completeren en een uniek dataset bieden ten behoeve van milieurisicoschatting.
- Uitvoering van genexpressieanalyses in additionele (transitionele) onderzoeken onder humane populaties met verschillende blootstellingomstandigheden alsmede metingen van meerdere klassieke biomarkers uit het continuüm zoals gepresenteerd in Figuur 2 in **Hoofdstuk 1**. Het verbinden van genexpressie-responsen aan deze biomarkers is belangrijk voor het belichten van de rol van veranderde genexpressie in relatie tot fenotypische cellulaire veranderingen.
- Het betrekken van informatie over polymorfismen in genen die belangrijk zijn bij carcinogene blootstelling bij de analyses, vanaf het opzetten van de studie, bijvoorbeeld door analyses te richten op individuen met wild-type of mutant allelen van die genen, of vanaf de data-analyse, door het verdelen van studiepopulaties op basis van polymorfismeprofiel, bijvoorbeeld 'worst case' of 'best case' profielen met betrekking tot functionele veranderingen van het gen door het polymorfisme.

Concluderend kan gezegd worden dat de data gepresenteerd in dit proefschrift erop wijzen dat genexpressieprofielering een waardevolle toepassing vormt voor gebruik in moleculaire epidemiologie. De resultaten openen deuren voor haar toepassing in humane biomonitoringstudies omdat genexpressieprofielering meer generieke informatie behelst over de gebeurtenissen die zich voordoen na carcinogene blootstelling als aanvulling op de momenteel in gebruik zijnde biomarkers. Dit onderzoek heeft daarom een fundament gelegd voor toekomstige toepassing van toxicogenomics in moleculaire epidemiologie.

References

1. Hamadeh, H.K., Bushel, P.R., Jayadev, S., DiSorbo, O., Bennett, L., Li, L., Tennant, R., Stoll, R., Barrett, J.C., Paules, R.S., Blanchard, K. and Afshari, C.A. (2002). Prediction of compound signature using high density gene expression profiling. *Toxicol Sci* 67, 232-240.
2. Bushel, P.R., Hamadeh, H.K., Bennett, L., Green, J., Ableson, A., Misener, S., Afshari, C.A. and Paules, R.S. (2002). Computational selection of distinct class- and subclass-specific gene expression signatures. *J Biomed Inform* 35, 160-170.
3. Hamadeh, H.K., Bushel, P.R., Jayadev, S., Martin, K., DiSorbo, O., Sieber, S., Bennett, L., Tennant, R., Stoll, R., Barrett, J.C., Blanchard, K., Paules, R.S. and Afshari, C.A. (2002). Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. *Toxicol Sci* 67, 219-231.